

UTILIZACION DE ISOENZIMAS DE EXTRACTOS DE HOJAS EN LA CARACTERIZACION DE CULTIVARES DE DURAZNERO (*Prunus persica* (L) Batsch)¹

HECTOR ABEL ALTUBE²; MONICA ONTIVERO URQUIZA²;
RAQUEL SUSANA RIVATA²; RICARDO JORGE TABORDA²

RESUMEN - La caracterización de cultivares de duraznero (*Prunus persica* (L) Batsch) se hace por medio de la descripción de caracteres agronómicos y morfológicos codificados por organizaciones internacionales, los cuales están fuertemente influenciados por el ambiente. Se han buscado métodos alternativos de caracterización y las isoenzimas han sido utilizadas por su independencia de las condiciones del ambiente, además de identificar individuos en etapas tempranas de su desarrollo.

El objetivo del presente estudio es caracterizar cultivares de duraznero mediante el análisis isoenzimático de catecol oxidasas, fosfatasa ácida, esterazas y peroxidazos en extractos de hojas.

Los cultivares de duraznero analizados presentaron bajo polimorfismo isoenzimático, las esterazas caracterizaron diez cultivares, las catecol oxidasas un cultivar agrupándose el resto en cinco modelos, las fosfatasa ácida caracterizaron dos cultivares agrupándose los otros en siete modelos y las peroxidazos formaron tres grupos. Ello puede explicarse ya que el duraznero es una especie autofértil y presenta una base genética muy reducida. Los evidentes límites discriminatorios de este tipo de análisis hacen que su aporte sea sólo complementario a los métodos de los caracteres agronómicos y morfológicos.

Palabras claves: durazno, isoenzimas cultivares, quimiotaonomía.

THE USE OF ISOZYME LEAF EXTRACTS IN THE CHARACTERIZATION OF PEACH CULTIVARS (*Prunus persica* L Batsch)

ABSTRACT - Characterization of peach cultivars (*Prunus persica* (L) Batsch) was made by description of agronomical and morphological characters codified from international organizations, which are strongly affected by environmental conditions. Alternative methods of characterization have been searched, and isoenzymes have been used as independent of environmental conditions in addition to identify some individuals in early stages of development.

The goal of this study is the peach cultivars characterization by isoenzymatic analysis of catecol oxidases, acid phosphatases, esterases and peroxidases within the leaf extracts.

The peach cultivars analyzed have showed low isoenzymatic polymorphism. Ten cultivars were characterized by esterases while one cultivar by catecol oxidases. The remainder cultivars were grouped into five models. The acid phosphatases have characterized two cultivars; the remainder was grouped into seven models. The peroxidases formed three groups.

This behavior can be explained since the peach is an autogamous species and it shows a very reduced genetic basis. The evident and discriminant restrictions of this type of analysis have got results that have been only a complementary form for the methods of agronomical and morphological characters.

Index terms: peach, isoenzyme, cultivars, chemiotaxonomy.

INTRODUCCION

La caracterización de los diferentes cultivares de duraznero (*Prunus persica* (L) Batsch) generalmente se hace por medio de caracteres agronómicos y morfológicos codificados en los descriptores preparados por organizaciones internacionales (UPOV, IBPGR, etc.). Estos caracteres están fuertemente influenciados por el ambiente (Dettweiler-Munch, 1993). Se han buscado métodos alternativos que permitan la caracterización para evitar los límites de las tradicionales. Las isoenzimas han sido utilizadas por la ventaja de su independencia de las condiciones del ambiente, además de poder identificar

individuos en etapas tempranas del crecimiento, que en caso de frutales para los caracteres agronómico-morfológicos serían necesarios algunos años, para que desarrollen plenamente y reflejen sus diferencias heredables. No obstante la técnica de preparación de las muestras, el análisis de las isoenzimas y el órgano de la planta estudiado pueden influenciar el resultado final.

Del análisis bibliográfico resulta que sólo fosfatasa ácida, diaforasa, esterazas, isocitrato dehidrogenasa, malato dehidrogenasa y peroxidasa, presentan polimorfismo y cada uno de ellos con una bajo número de combinaciones discriminatorias en duraznero (Sansavini y Pancaldi, 1994).

¹ Trabalho nº 022/2000. Recebido: 24/02/2000. Aceito para publicação: 27/06/2001.

² Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Producción Vegetal: Fruticultura. Casilla de Correo 509, (5000) Córdoba, Argentina. E-Mail: healtube@agro.uncor.edu.

Messeguer et al.,1987, analizaron 14 sistemas enzimáticos y esterasas, isocitrato dehidrogenasas, malato dehidrogenasas y fosfatasa ácida, presentaron un total de 25 polimorfismos, de los cuales 13 pertenecieron a variedades de duraznero. Resultados similares fueron obtenidos por Reynder y Monet (1987), Gambardella (1987) Durham (1987). Ibañez et al. (1993) calcularon la variabilidad isoenzimática de esterasas, peroxidasa y malato dehidrogenasas en nectarinas (H=0,18), duraznos (H=0,31) e industria (H=0,75). Altube et al. (1999) en extractos de brindillas y con las isoenzimas catecol oxidasa y esterasas encontraron algunas diferencias entre los cultivares y se construyeron diez grupos fenotípicos isoenzimáticos que difieren por lo menos en uno de los zimogramas. Las isoenzimas presentan dificultades para la caracterización de cultivares de duraznero; no así para distinguir diferentes especies del género *Prunus* (Friend y Carter,1989; Mowrey et al.,1990); detectar precozmente los cruzamientos de duraznero x almendro (Chaparro et al.,1987) y caracterizar portainjertos de duraznero (Altube et al.,1998).

El objetivo del presente estudio es caracterizar cultivares de duraznero mediante el análisis isoenzimático en extractos de hojas.

MATERIAL Y METODOS

Los cultivares utilizados de durazneros utilizados en el estudio fueron: 1. Red Globe, 2. June Gold, 3. Regina, 4. Starkdelicious, 5. Kuracata, 6. Maada, 7. Springold, 8. Armgold, 9. Novedad de Córdoba, 10. Meadowlark, 11. July Elberta, 12. Springcrest, 13. San Pedro 1633, 14. Flordaking, 15. Flavorcrest, 16. Dixiland. Las plantas contaban con doce años de edad. Los muestreos se realizaron durante el mes de octubre, recogiendo hojas recién formadas, las cuales fueron conservadas a -14°C hasta su procesamiento.

La extracción de las isoenzimas se realizó a 4°C, homogeneizando 1 g de tejido con 3 cc de tampón de extracción (Arulsekar y Parfitt, 1986). El homogeneizado se centrifugó 3000 rpm a 4°C durante 5 minutos. La separación electroforética se realizó en una cuba Mini Protean II Bio Rad, con geles de polyacrilamida al 10%. Tampón de electrodos Tris-Glicocola (3 g Tris y 14,2 g de glicocola, completar a 2 l.) pH 8,6. La corrida se realizó a 3mA por pocillo durante 45 minutos, luego de un período de estabilización de 15 minutos a 2mA. Las isoenzimas estudiadas fueron Peroxidasa (PER) (E.C.1.11.1.7); Esterasa (EST) (E.C.3.1.16); Catecol oxidasa (CO) (E.C.10.3.1) Fosfatasa ácida (F.AC) (E.C.3.1.3.2). La tinción de los geles se realizó con los métodos propuestos por Brewer y Sing (1971).

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos utilizando un programa computarizado «Numerical Taxonomy System»(NTSYS). Las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) fueron las variedades estudiadas. Las matrices de datos alternativos con valores 0 o 1 para indicar la ausencia o presencia de una banda en el zimograma correspondiente se prepararon con los caracteres evaluados. Una vez obtenida la matriz de datos, se procedió a calcular con el NTSYS la matriz de distancias entre OTUs. Con base en la matriz de distancia se calcularon las similitudes entre OTUs, (utilizando para su cálculo el coeficiente de Jaccard (Crisci y López Arntengol, 1983) y mediante el programa SAHN de NTSYS se

obtuvo el dendrograma de agrupamiento de OTUs utilizando el algoritmo del ligamiento promedio UPGMA (Sneath y Sokal,1973).

RESULTADOS Y DISCUSION

Catecol oxidasa. La Fig. 1 presenta los zimogramas de las catecol oxidasa, con un total de seis bandas, la banda cuatro está presente en todos los cultivares y seis modelos isoenzimáticos agrupan a los cultivares. El modelo 1 con las bandas 2, 3, 4, 5 agrupa los cultivares: Red Globe y June Gold. El modelo 2 con las bandas 2, 4, 5 los cultivares: Regina y Starkdelicious. El modelo 3 con las bandas 4 y 5 los cultivares: Kuracata, Maada, Springold y Armgold. El modelo 4 con las bandas 1, 3, 4 los cultivares Novedad de Córdoba, Meadowlark y July Elberta. El modelo 5 con las bandas 3, 4, 6 los cultivares Springcrest, San Pedro 1633, Flordaking y Flavorcrest. El modelo 6 con las bandas 3 y 4 el cultivar Dixiland.

Las isoenzimas catecol oxidasa permitieron caracterizar sólo el cultivar Dixiland.

Fosfatasa ácida. La Fig. 2 presenta los zimogramas de las fosfatasa ácida con un total de seis bandas y nueve modelos isoenzimáticos agrupan los cultivares. El modelo 1 con las bandas 1, 3, 5, 6 agrupa los cultivares: Red Globe, Kuracata, Maada, Springold. El modelo 2 con las bandas 1, 3, 6 el cultivar June Gold. El modelo 3 con las bandas 1, 2, 3, 5, 6 el cultivar Regina. El modelo 4 con las bandas 1, 2, 3, 6 el cultivar Starkdelicious. El modelo 5 con las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6 el cultivar Armgold. El modelo 6 con las bandas 1, 3, 4, 6 el cultivar Novedad de Córdoba. El modelo 7 con las bandas 1, 2, 4, 6 los cultivares: Meadowlark, July Elberta y Springcrest. El modelo 8 con las bandas 1, 4, 6 el cultivar San Pedro 1633. El modelo 9 con las bandas 1, 2, 4, 6 los cultivares: Flordaking, Flavorcrest y Dixiland. Las isoenzimas fosfatasa ácida caracterizaron los cultivares Starkdelicious, Novedad de Córdoba, June Gold, Regina, Armgold y San Pedro 1633.

Esterasa. La Fig. 3 presenta los zimogramas de las esterasas con un total de once bandas y catorce modelos isoenzimáticos. El modelo 1 con las bandas 1, 5, 10 los cultivares: Red Globe y June Gold. El modelo 2 con las bandas 5, 6, 10, 11 el cultivar Regina. El modelo 3 con las bandas 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 el cultivar Starkdelicious. El modelo 4 con las bandas 3, 4, 6, 9, 10, 11 el cultivar Kuracata. El modelo 5 con las bandas 3, 4, 6, 10, 11 el cultivar Maada. El modelo 6 con las bandas 3, 4, 10 el cultivar Springold. El modelo 7 con las bandas 1, 3, 4, 8, 10 el cultivar Armgold. El modelo 8 con las bandas 1, 3, 8 el cultivar Novedad de Córdoba. El modelo 9 con las bandas 1, 2, 5, 8 el cultivar Meadowlark. El modelo 10 con las bandas 1, 2, 3, 5, 7, 8 el cultivar July Elberta. El modelo 11 con las bandas 1, 2, 5, 7, 8 los cultivares Springcrest y San Pedro 1633. El modelo 12 con las bandas 1, 2, 5, 8 el cultivar Flordaking. El modelo 13 con las bandas 1, 2, 5, 7, 8 los cultivares Flavorcrest y Dixiland.

Estas son las isoenzimas que presentaron mayor variabilidad, resultados concordantes con los obtenidos por Sansavini y Pancaldi (1994), Messeguer et al.(1987). Las isoenzimas esterasas son las que presentan mayor polimorfismo y permiten caracterizar los cultivares Regina, Starkdelicious,

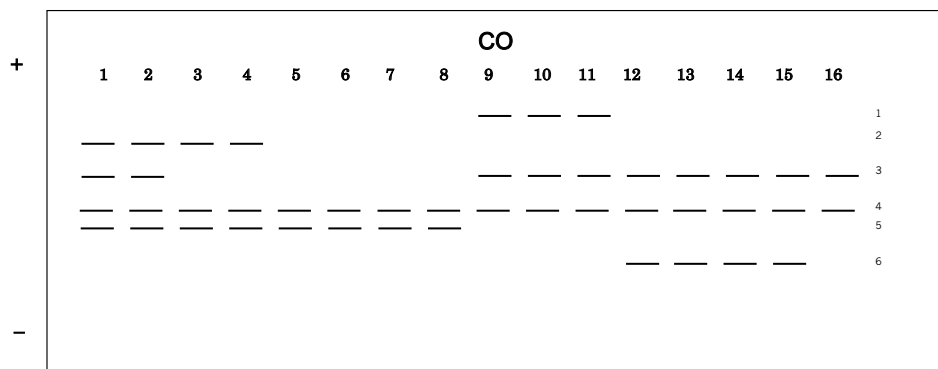


FIG. 1.- Zimograma de las catecol oxidasas en cultivares de duraznero.

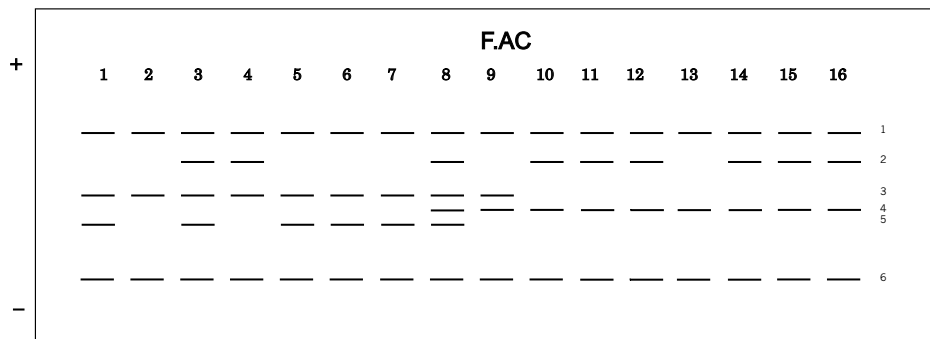


FIG. 2.- Zimograma de las fosfatasas acidas en cultivares de duraznero.

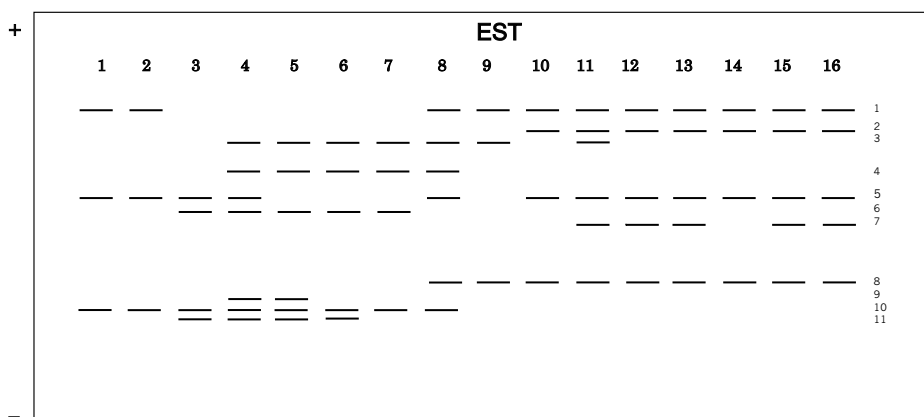


FIG. 3.- Zimograma de las esterasas en cultivares de duraznero.

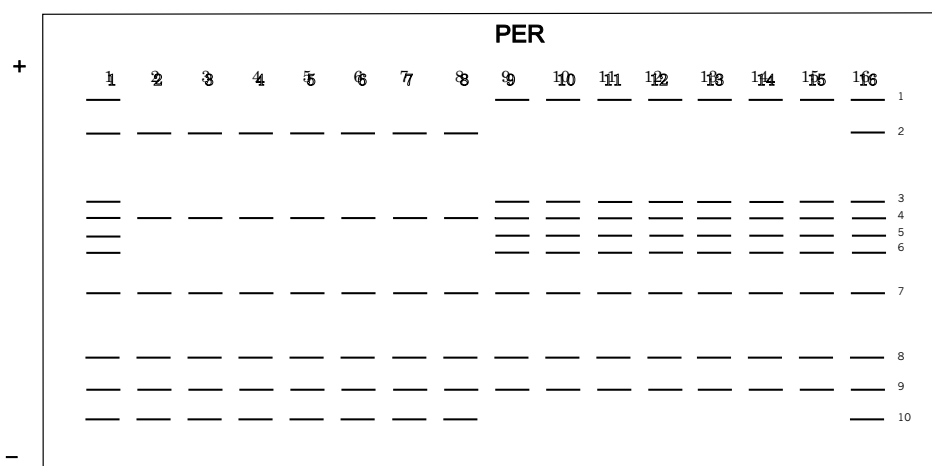


FIG. 4.- Zimograma de las peroxidasas en cultivares de duraznero.

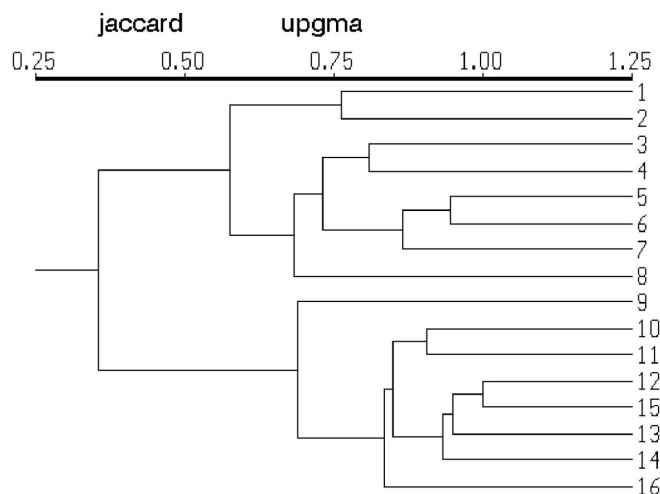


FIG. 5. - Dendrograma de agrupación resultante (Método UPGMA) de las bandas de las isoenzimas catecol oxidadas, fosfatasa ácida, esterasa y peroxidasa de los extractos de hojas de los cultivares de duraznero.

Kuracata, Maada, Springold, Armgold, Meadowlark, July Elberta, Flordaking y Novedad de Córdoba.

Peroxidasas. La Fig. 4 presenta los zimogramas de las peroxidasa con un total de diez bandas, de las cuales 4, 7, 8, 9 están presentes en todos los cultivares, estas agrupan a los tipos estudiados en tres modelos isoenzimáticos. El modelo 1 con las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 los cultivares Red Globe y Dixiland. El modelo 2 con las bandas 2, 4, 7, 8, 9, 10 los cultivares June Gold, Regina, Starkdelicious, Kuracata, Maada, Springold y Armgold. El modelo 3 con las bandas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 los cultivares Novedad de Córdoba, Meadowlark, July Elberta, Springcrest, San Pedro 1633, Flordaking y Flavorcrest. Las peroxidasa no permiten caracterizar los cultivares estudiados, tan sólo la agrupación de los mismos, datos que concuerdan con los obtenidos por Ibañez et al. (1993)

El dendrograma resultante de los distintos sistemas enzimáticos en tallos (Fig. 5), presenta dos ramas, la primera a un nivel aproximado de 0,60 que agrupa los cultivares: Red Globe, June Gold, Regina, Starkdelicious, Kuracata, Maada, Springold y Armgold y la segunda a un nivel de 0,80 con los cultivares: Novedad de Córdoba, Meadowlark, July Elberta, Springcrest, San Pedro 1633, Flordaking, Flavorcrest y Dixiland. Ambas ramificaciones presentan subgrupos

CONCLUSIONES

Las distintas variedades de duraznero analizadas presentaron un bajo polimorfismo isoenzimáticos, sólo las esterasas caracterizaron un gran número de variedades y el resto de las isoenzimas agruparon los tipos estudiados en un número de modelos isoenzimáticos más o menos grande. Lo que puede explicarse por ser el duraznero una especie generalmente autofértil y presentar una base genética muy reducida. Por lo tanto, los evidentes límites discriminatorios de este tipo de análisis hacen

que su aporte sea sólo complementario a los métodos de los caracteres agronómicos y morfológicos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba, por haber financiado el proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUBE, H.A., ONTIVERO URQUIZA, M.G., RIVATA, R.S., TABORDA R.J. Y BUDDE C.O. Caracterización de cultivares de duraznero (*Prunus persica* (L) Batsch) mediante el polimorfismo isoenzimático. **Phyton Int. J. Exp. Bot.**, v.65, p.65-70, 1999

ALTUBE H.A., RIVATA R.S., ONTIVERO URQUIZA M.G., BUDDE C. O., TABORDA R.J. 1998. Caracterización de portainjertos de duraznero mediante las isoenzimas: peroxidasa, catecol oxidasa y esterasa. **Phyton Int. J. Exp. Bot.**, v. 63, n1/2), p.81-86, 1998.

ARULSEKAR S., PARFITT D.E. Isozyme analysis procedures for stones fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 4, p.928-933, 1986

BREWER G.J.; SING. C.F. **Introduction to isozyme techniques.** New York: Acad. Press. 1971. 186p.

CRISCI J.V.; LOPEZ-ARMENGOL M.F. **Teoría y práctica de la taxonomía numérica.** Washington, D.C.: O.E.A. Secretaría General, 1989. 130 p.

CHAPARRO J.X.; DURHAM R.E.; MOORE G.A.; SHERMAN W.B. Use of isozyme techniques to identify peach x Nonpareil almond hybrids. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n.2, p.300-302, 1987.

DETTWEILER-MUNCHE. Influence of climate on morphologic characteristic of grapevines. **Vitis**, Siefeldinzen, 32, p. 253, 1993.

DURHAM R.E., MOORE G.A.; SHERMAN W.B. Isozyme banding patterns and their usefulness as genetic markers peach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n.6, p.1013-1018, 1987

FRIEND H.A.; CARTER G.E. Isozyme analysis for identification of *Prunus spescies* and F1 hybrids. **Acta Horticulturae**, Wazeninzen, v. 254, p. 243-248, 1989.

GAMBARDELLA M. **Genética del melocotonero (*Prunus persica* (L) Batsch), heredabilidad de caracteres agronómicos y estudio isoenzimático**, 1987. 125p. Tesis (MSc) - Instituto Agronómico Mediterraneo de Zaragoza, 1987.

IBAÑEZ M.A., DI RENZO M.A., POVERENE M.M. Isozyme diversity among within peach groups: freestone, clingstone and nectarines. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 53, p.281-288,

1983.

MESSEGUER P., ARUS P., CARRERA M. Identification of peach cultivars with the pollen isozymes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 31, p.107-117, 1987.

MOWREY B.D.; WERNER D.J. Development specific isozyme expression in peach. **HortScience**, Alexandria, v 25, n. 2, p.219-222, 1990

REYNDERS S.; MONET R. Evolution au cour du temps de la consanguinité des variétés de pécher. Etude des distances

génétiques entre quelques géniteurs. **Fruits**, Paris, v. 42, n. 9, p.529-535, 1987

SANSAVINI S.; PANCALDI M. **Ruolo delle biotecnologie molecolari nella identificazione, moltiplicazione e diffusione di materiale in frutticoltura. Convegno de Tecnologie avanzate per l' identificazione varietale e il controllo genetico-sanitario nel vivaismo fruttivendolo.** Agro-Bio-Frut, Cesena. 1994.

SNEATH P. H. A. SOKAL R.R. **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.** San Francisco: W.F. Freeman, 1973.